DOI:10.12441/spyswjs.20221207006 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0143-08

非酿酒酵母的选育及其改善枸杞酒香气品质的研究

吴殿辉[1,2,3,5] 赵苗苗[1,2,3,5] 赵智慧[4] 董建方[4] 马 艳[4] 陆 健[1,2,3,5*]

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心,江苏 无锡 214122; 4. 宁夏红枸杞产业有限公司,宁夏 中卫 755000; 5. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:枸杞酒香气不足以及典型性不突出等问题限制了枸杞发酵酒行业的发展。从‘宁杞5号’枸杞果和果园土壤中得到26株非酿酒酵母,筛选出6株产β-葡萄糖苷酶(β-*D*-Glucosidase, β-G)能力较强的非酿酒酵母,通过生长曲线测定以及乙醇、渗透压耐受性测定探究其生理特性,优选出异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)Y11与酿酒酵母M-23-7-14混合发酵枸杞酒,以常规理化指标、风味物质和感官品质为指标分析枸杞酒品质。结果表明,当酿酒酵母M-23-7-14与异常威克汉姆酵母Y11按接种量10∶1接种,且先接种异常威克汉姆酵母Y11,间隔12 h接种酿酒酵母M-23-7-14时,体系发酵性能最优。相较于纯种发酵,混菌发酵时枸杞酒风味物质的总质量浓度提高了21.7%,其中酯类物质的质量浓度比纯种发酵提高了85.8%。该研究为枸杞发酵酒行业提供了优良酵母,并优化了枸杞酒的发酵工艺,提升了枸杞酒香气品质,为工业化生产提供了理论支持。

关键词:枸杞酒;非酿酒酵母;β-葡萄糖苷酶;风味物质

Breeding of Non-*Saccharomyces cerevisiae* Strain and Its Application in Improving the Aromatic Quality of Wolfberry Wine

WU Dianhui[1,2,3,5] *ZHAO Miaomiao*[1,2,3,5] *ZHAO Zhihui*[4] *DONG Jianfang*[4] *MA Yan*[4] *LU Jian*[1,2,3,5*]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Ningxia Red Wolfberry Industry Group Co., Ltd., Zhongwei 755000, China; 5. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Insufficient aroma and unremarkable typicality of wolfberry wine limit the development of the wolfberry wine industry. Twenty-six strains of non-*Saccharomyces cerevisiae* (non-*S. cerevisiae*) were isolated from *Lycium barbarum* 'Ningqi No. 5' fruit and orchard soil. Six non-*S. cerevisiae* strains with excellent β-glucosidase (β-G) production ability were screened. Their physiological characteristics were determined using growth curve analysis and tolerance tests to ethanol and osmotic pressure. The co-fermentation of *Wickerhamomyces anomalus (W. anomalus)* Y11 with *S. cerevisiae* M-23-7-14 was optimized for wolfberry wine production, with quality assessed based on conventional physicochemical indices, flavor compounds, and sensory evaluation. Results indicated that the optimal fermentation performance was achieved when *S. cerevisiae* M-23-7-14

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划项目(2020BFH2005);高等学校学科创新引智计划(111计划)项目(111-206);江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通信作者:陆健(1968—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酿酒工程与食品生物技术研究。E-mail:jlu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-12-07 **改回日期:**2023-04-25

and *W. anomalus* Y11 were inoculated at an inoculum amount of 10∶1, with *W. anomalus* Y11 inoculated first, followed by *S. cerevisiae* M-23-7-14 after a 12 h interval. In comparison to single-strain fermentation, the total mass concentration of flavor compounds increased by 21.7% during the mixed-strain fermentation, with a 85.8% increase in the concentration of esters. This study could provide a superior yeast for the wolfberry wine industry, optimize the fermentation process, and enhance the aroma quality of wolfberry wine, offering theoretical support for industrial production.

Keywords: wolfberry wine; non-*Saccharomyces cerevisiae*; *β*-glucosidase; flavor compound

枸杞作为一种药食同源的食物，富含氨基酸、有机酸、维生素、枸杞多糖、粗蛋白以及粗纤维等多种营养物质，能够提高人体免疫力，并具有延缓衰老和抗肿瘤的作用[1]。枸杞果酒是以枸杞果或枸杞干为原料，经酵母作用得到的发酵型果酒，能够较好地保留枸杞中的生物活性物质和营养物质。果汁中的芳香物质以游离态和键合态两种形式存在，键合态的物质没有呈香功能，它能在酶的作用下裂解糖苷键释放出芳香化合物，从而增加果汁香气[2]。*β*-G是一种纤维素类水解酶，它能够特异性地水解*β*-*D*-葡萄糖苷键，从而释放出香气成分，进而提高产品的风味品质[3]。酿酒酵母通常缺乏合成*β*-G的能力，而大多数非酿酒酵母具备合成*β*-G的能力。因此，筛选产*β*-G的非酿酒酵母并将其用于酒类生产，以促进酒体香气物质的产生，提升酒体品质是当今酿酒行业的研究热点。Yan等从米酒中筛选出一株异常威克汉姆酵母HN006用于葡萄酒发酵，使葡萄酒中酯类物质增加了10种，质量浓度提高了180.1%，醇类物质增加了6种，质量浓度由4.70 mg/L提高到58.27 mg/L，酸类物质增加了6种，质量浓度从47.85 mg/L提高到58.38 mg/L，提升了葡萄酒的香气[4]。何松等从水蜜桃表皮和果肉中筛选出毕赤酵母（*P. cephalocereana*）hsmt-1和梅奇酵母（*Metschnikowia sinensis*）hsmt-6，这2株酵母在发酵过程中能产生较多的酯类、醇类和醛酮类物质[5]。Shi等用酿酒酵母SLY-4和库德毕赤酵母（*P. kudriavzevii*）F2-24共同发酵葡萄酒，结果发现与纯种发酵相比，混菌发酵的酒体中挥发性酸较低，香气成分质量浓度提高了96.4%，改善了葡萄酒的风味和品质[6]。

因此，作者从枸杞汁发酵液中分离筛选产*β*-G的非酿酒酵母，并通过测定菌株的生长曲线以及耐受性，研究其生理特性，选育出一株发酵性能优良且高产*β*-G的非酿酒酵母菌株，并将其应用于枸杞酒的酿造以提高枸杞酒的风味物质，为发酵型枸杞酒品质提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 *原料与试剂* 酿酒酵母M-23-7-14：作者所在课题组从枸杞果中选育；‘宁杞5号’枸杞果干及果园土壤：宁夏红枸杞产业有限公司；果胶酶：白银赛诺生物科技有限公司；七叶灵、对硝基苯酚、4-硝基苯基-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷（p-NPG）：阿拉丁（上海）生物科技有限公司。

1.1.2 *培养基* YPD培养基：酵母提取物1 g/dL、葡萄糖2 g/dL、胰蛋白胨2 g/dL，在固体培养基中添加2 g/dL琼脂粉，115 ℃灭菌20 min；筛选培养基：$FeCl_3$ 0.05 g/dL、七叶灵0.1 g/dL、NaCl 0.5 g/dL、2.0 g/dL琼脂，pH调至5.0后，115 ℃灭菌30 min；种子培养基：蛋白胨2.0 g/dL、葡萄糖10.0 g/dL、$MgSO_4$ 0.5 g/dL、K_2HPO_4 1.0 g/dL，pH调至7.2后，115 ℃灭菌30 min；发酵培养基：葡萄糖2.0 g/dL、酵母粉1.0 g/dL、蛋白胨2.0 g/dL、KH_2PO_4 0.4 g/dL、$(NH_4)_2SO_4$ 0.3 g/dL、吐温-80 2 mL/L，使用蒸馏水配制，自然pH，115 ℃灭菌30 min。WLN培养基：海博生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 *非酿酒酵母的初步筛选* 取枸杞果干5 g，置于30 mL无菌水中，室温培养12 h，摇匀，梯度稀释，涂布于YPD固体培养基表面，30 ℃培养48 h。菌落生长后，挑取单个菌落在YPD固体培养基上进行划线纯化，并保存于4 ℃备用。

1.2.2 *产β-葡萄糖苷酶菌株的筛选* 初筛：将无菌牛津杯（内径6 mm×外径8 mm×高10 mm）垂直插入筛选培养基表面，向牛津杯中加入100 μL活化的菌液，密封，于30 ℃培养24 h，筛选黑色圆圈直径较大且颜色较深的菌株。

复筛：将初筛所获目的菌株活化后，按体积分

数2%接种于种子培养基中，在30 ℃下以220 r/min培养24 h。然后将种子液（体积分数2%）接种到发酵培养基中，在相同条件下培养48 h，离心收集上清液（4 ℃、10 000 r/min、10 min），得到用于酶活力测定的β-G粗酶液，从中筛选出酶活力较高的菌株。

1.2.3 酶活测定 β-G酶活的测定参考李亚辉等的方法[7]。其中加热失活的酶液作为空白样，对硝基苯酚的标准曲线方程为：y=0.001 5x-0.070 1，R^2=0.991 9。

1.2.4 产β-葡萄糖苷酶菌株的性能测试

（1）生长曲线的测定：参考冯文倩等的方法[8]测定酵母的生长曲线。

（2）乙醇耐受性测定：参考吴健等的方法[9]测定乙醇耐受性，将酵母接种体积分数调整为2%。

（3）渗透压耐受性测定：参考吴健等的方法[9]测定渗透压耐受性。将YPD液体培养基中的糖质量浓度调整为50、100、150、200、250、300 g/L，设置酵母接种体积分数为2%。

1.2.5 混菌发酵酿造枸杞酒

（1）发酵条件：将20 g枸杞与200 mL纯净水混合打浆，用白砂糖将葡萄糖质量浓度调整为200 g/L，添加偏重亚硫酸钾，加入30 U/g果胶酶，发酵温度20 ℃。通过每24 h测定CO_2质量损失来监测发酵过程，24 h内质量减轻小于0.2 g视为发酵结束，发酵结束后过滤发酵液，测定枸杞酒的理化指标及风味物质质量浓度。

（2）接种方式的选择：将酿酒酵母与产β-G的非酿酒酵母同时接种或顺序接种（先接种非酿酒酵母，后接种酿酒酵母，间隔12 h）至枸杞汁中进行混菌发酵，以单独添加酿酒酵母作为对照。酿酒酵母的接种量为1×10^7 CFU/mL，非酿酒酵母的接种量为5×10^6 CFU/mL。

（3）菌株接种比的选择：将酿酒酵母与产β-G的非酿酒酵母按15∶1、12∶1、10∶1、6∶1、4∶1、2∶1、1∶1顺序接种（间隔12 h）至枸杞汁。酿酒酵母的接种量为1×10^7 CFU/mL，非酿酒酵母的接种量按比例得出。

1.2.6 枸杞酒理化指标分析 乙醇体积分数、总糖及总酸质量浓度根据GB/T 15038—2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》中描述的方法测定[10]。

1.2.7 枸杞酒挥发性风味物质分析 枸杞酒中的风味物质采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱（HS-SPME-GC-MS）联用法分析。顶空固相微萃取步骤：采用50 μm/30 μm CAR/DVB/PDMS的SPME纤维萃取头，准确移取6.0 mL样品和60 μL内标物（5 mg/L的2-辛醇）于10 mL萃取瓶中，50 ℃下萃取30 min。GC-MS检测条件：DB-Wax色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；载气是氦气，流量1.5 mL/min；进样口和检测器温度250 ℃，离子源温度260 ℃；EI为电离源；升温程序为初始温度50 ℃，保持2 min，以15 ℃/min升温至230 ℃，保持15 min。通过比对NIST质谱库中的标准光谱进行定性分析，采用内标法对挥发性化合物进行定量分析[11]。

1.2.8 数据分析 每个独立试验重复3次，结果以平均值±标准偏差表示。使用Origin 2020b绘图。使用IBM SPSS Statistics 25.0软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 非酿酒酵母的初步筛选结果

从枸杞自然发酵液中分离出58株菌，通过18S rDNA鉴定出非酿酒酵母26株，其中毕赤酵母6株，编号为B1~B6；戴尔有孢圆酵母4株，编号为D7~D10；异常威克汉姆酵母16株，编号为Y11~Y26。

β-G在含有七叶灵和三价铁显色底物的培养基中能水解七叶灵生成七叶甙原，该物质可以和三价铁作用呈棕黑色，使菌落周围产生棕黑色的环状物[12]。黑色圈的直径和颜色深浅能够反映酶活大小，依据直径大、颜色深的原则筛选产β-G能力强的酵母。

28株酵母在七叶灵培养基中培养48 h的结果见表1。28株酵母周围均形成黑色圆圈，但呈现效果不同。酵母Y12显现出的黑色圆圈颜色最深且直径最大（3.0 cm），其次是酵母Y20、Y11、Y16、Y13和D10，这一现象表明非酿酒酵母产β-G的能力比酿酒酵母强。

进一步对初筛得到的6株酵母进行产β-G能力测定，结果见图1。酵母Y11产生的酶活力最高，为149.58 U/mL，其次是酵母Y12（104.24 U/mL）和Y20（98.91 U/mL）。为了筛选出最优良的酵母菌株，进一步分析这3株非酿酒酵母的生长曲线和耐受性。

表 1　产 β-G 酵母菌株的筛选

Table 1　Screening of β-G-producing yeast strains

菌种	菌株编号	黑色圆圈直径/cm	黑色深浅程度
酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*	M-23-7	0.8	+
	安琪 SY	0.8	+
毕赤酵母 *Pichia pastoris*	B1	0.8	+
	B2	0.8	+
	B3	0.8	+
	B4	0.8	+
	B5	0.8	+
	B6	0.8	+
戴尔有孢圆酵母 *Torulaspora delbrueckii*	D7	0.8	+
	D8	0.8	+
	D9	0.8	+
	D10	2.0	++
异常威克汉姆酵母 *Wickerhamomyces anomalus*	Y11	2.5	+++
	Y12	3.0	+++
	Y13	2.1	+++
	Y14	1.3	+
	Y15	1.0	+
	Y16	2.5	+++
	Y17	1.0	+
	Y18	2.0	++
	Y19	1.9	++
	Y20	2.7	++
	Y21	1.5	+++
	Y22	1.5	+++
	Y23	1.1	+
	Y24	1.5	+++
	Y25	2.0	++
	Y26	1.5	+++

注：+++表示颜色很深；++表示颜色较深；+表示颜色很浅。

2.2　产 β-G 酵母的生长曲线

图 2 显示了 3 株非酿酒酵母的生长曲线，以 OD_{600} 表征菌体在 YPD 液体培养基中的浓度。在 6~20 h，3 株酵母处于对数生长期，20 h 后达到稳定期。相较于酵母 Y20 和 Y12，酵母 Y11 在 YPD 液体培养基中的生长性能最佳，生长速度最快，且在稳定期具有最高的菌体浓度，培养 24 h 后 OD_{600} 达到 23.5。

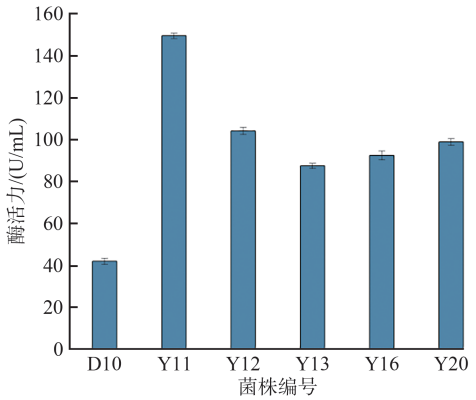


图 1　酵母菌株产 β-G 的结果

Fig. 1　Results of β-G production by yeast strains

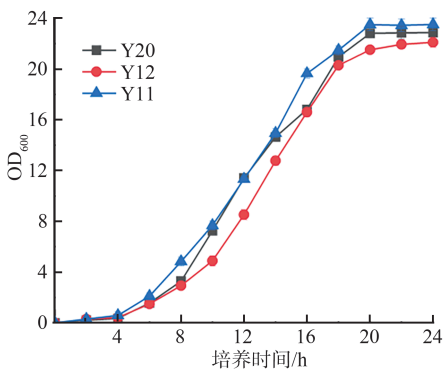


图 2　酵母菌株的生长曲线

Fig. 2　Growth curves of yeast strains

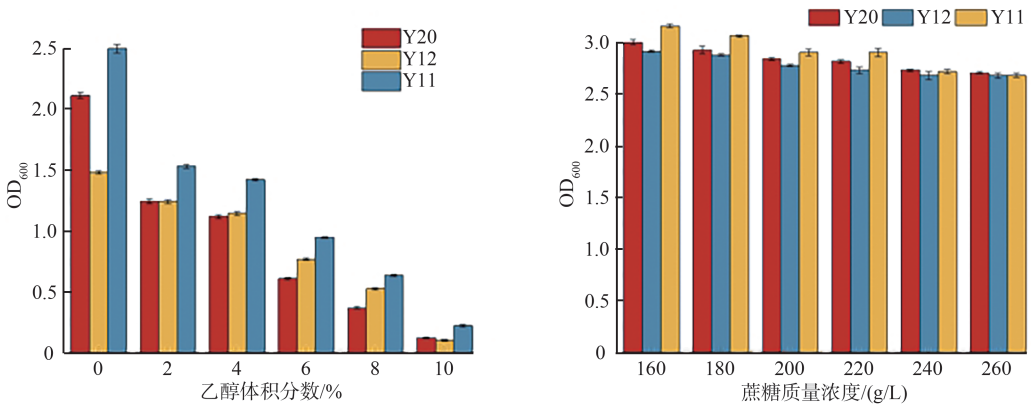
2.3　产 β-G 酵母的耐受性分析

酿造过程中非酿酒酵母的生长会受到乙醇体积分数和渗透压等因素的胁迫，筛选出耐受性强的菌株对果酒发酵具有重要意义。

果酒发酵过程中，乙醇体积分数先呈上升趋势，之后趋于稳定。当乙醇体积分数高于酵母的耐受值时，会抑制酵母生长甚至造成酵母消亡。图 3(a)显示了酵母 Y20、Y12 和 Y11 在乙醇体积分数为 0~10% 时的生长情况。由于乙醇体积分数的提高，3 株酵母在 600 nm 处的 OD 值均不断下降，表明酵母生长受到乙醇的抑制。在乙醇体积分数为 6% 时，酵母 Y20 的 OD_{600} 降至 0.61，相较于无乙醇时(OD_{600} 为 2.11)下降了 71.09%；3 株酵母在乙醇体积分数低于 8% 时均能生长，但当乙醇体积分数达到 10% 时，几乎均不能生长。在相同的乙醇体积分数下，酵母 Y11 的菌体浓度明显高于 Y12 和 Y20，对乙醇的耐受能力更强。

高质量浓度的糖会对酵母细胞造成一定渗

透压力，导致酵母生长受到胁迫。图3(b)显示了酵母Y20、Y12和Y11在蔗糖质量浓度为160~260 g/L时的生长情况。随着蔗糖质量浓度的增加，OD_{600}略微下降，当蔗糖质量浓度处于最大值(260 g/L)时，3株酵母仍能保持生长，相比于160 g/L时，酵母Y20、Y12、Y11菌体浓度分别下降9.9%、7.9%和15.6%。因此，酵母的生长在一定程度上受高渗透压的抑制，筛选出的这3株酵母对渗透压表现出良好的耐受性，具有较好的应用潜力。



(a) 酵母菌株的乙醇耐受性　　(b) 酵母菌株的渗透压耐受性

图3　酵母菌株的耐受性

Fig. 3　Tolerance of yeast strains

2.4　混菌发酵枸杞酒

通过对酵母Y20、Y12和Y11的生长曲线和耐受能力进行综合考量，优选酵母Y11与酿酒酵母M-23-7-14混菌发酵枸杞酒。目前，异常威克汉姆酵母已广泛应用于混菌发酵猕猴桃酒、空心李果酒和复合果酒等酒中[13-15]。因此有必要探讨异常威克汉姆酵母对发酵枸杞酒的影响，进一步挖掘其增香潜能。

2.4.1　*接种方式对枸杞酒发酵的影响*　接种方式对枸杞酒常规理化指标及感官品质的影响见表2。3种接种方式中，发酵枸杞酒的乙醇体积分数、总酸和总糖质量浓度未见明显异常，混菌发酵对枸杞酒的理化指标无明显影响，说明非酿酒酵母用于提高发酵枸杞酒的香气具有可行性。添加非酿酒酵母Y11可竞争性消耗发酵醪液中的营养物质，影响了酿酒酵母M-23-7-14的生长和发酵性能，从而使枸杞酒酿造时间稍有增加。而相较于纯种发酵，混菌发酵枸杞酒中风味物质的质量浓度有所提高，特别是采用顺序接种方式时，枸杞酒风味物质的质量浓度最高，且枸杞酒具有明显的果香和花香，说明非酿酒酵母Y11能够对提升枸杞酒香气品质发挥重要作用。综上，将顺序接种(间隔12 h)确定为枸杞酒发酵的最优接种方式。

2.4.2　*接种比对枸杞酒发酵的影响*　接种比对枸杞酒理化指标及感官品质的影响见表3。接种比对枸杞酒的总酸、总糖未产生明显影响。但随着酵母Y11的接种量增加，枸杞酒的乙醇体积分数基本不断下降，原因可能是非酿酒酵母将糖转化成非乙醇的物质，从而导致发酵枸杞酒的乙醇体积分数降低。此外，当接种比为10∶1时，枸杞酒风味物质的质量浓度最高，且具有较强的果香和花香味。因此，确定酵母M-23-7-14和Y11接种比为10∶1。

表2　接种方式对枸杞酒常规理化指标及感官品质的影响

Table 2　Effects of inoculation ratio on physicochemical properties and sensory evaluation of wolfberry wine

接种方式	乙醇体积分数/%	总糖质量浓度/(g/L)	总酸质量浓度/(g/L)	风味物质质量浓度/(μg/L)	发酵周期/d	感官评价
纯种发酵	10.40±0.05	5.26±0.02	3.71±0.06	30 441.4±56.9	5.5	香气不足
同时接种发酵	10.05±0.06	6.26±0.05	3.71±0.05	36 333.2±67.2	6.0	酵母味较重
顺序接种发酵	10.00±0.14	5.86±0.07	3.21±0.02	45 091.4±43.8	6.5	果香、花香突出

表 3 接种比对枸杞酒常规理化指标及感官品质的影响

Table 3 Effects of inoculation ratio on physicochemical properties and sensory evaluation of wolfberry wine

酵母 M-23-7-14 和 Y11 接种比	乙醇体积分数/%	总糖质量浓度/（g/L）	总酸质量浓度/（g/L）	风味物质质量浓度/（μg/L）	感官评价
1∶1	10.16±0.02	4.40±0.22	4.22±0.11	32 981.70±189.50	酵母味较重
2∶1	10.28±0.04	4.88±0.48	3.96±0.28	40 688.40±192.40	香气单薄
4∶1	10.34±0.03	4.76±0.16	4.35±0.22	40 006.64±61.95	香气单薄，口感粗糙
6∶1	10.28±0.04	4.40±0.22	4.12±0.28	52 304.85±103.75	香气单薄，口感粗糙
10∶1	10.61±0.06	4.48±0.24	4.02±0.46	71 506.35±108.50	果香、花香突出
12∶1	10.63±0.03	4.45±0.18	4.12±0.28	38 442.60±189.40	香气单薄
15∶1	10.70±0.07	4.34±0.26	4.28±0.32	29 828.50±178.50	酒体寡淡、香气不突出

2.5 混菌发酵过程中 β-G 活力变化

混菌发酵过程中 β-G 活力变化见图 4。纯种发酵和混菌发酵的整个发酵过程中都检测到了 β-G 活力，且酶活力在发酵前期逐渐增加，第 2.5 天达到最大值，纯种发酵和混菌发酵方式下酶活力分别为 15.79、21.48 U/mL。随后 β-G 活力开始降低，当发酵时间为 4.5 d，酶活力趋于稳定，纯种发酵和混菌发酵方式下的 β-G 活力分别为 5.09、5.75 U/mL。在发酵后期，发酵液中的营养物质被消耗，菌体生长受到抑制，β-G 活力降低。在整个发酵过程中，混菌发酵枸杞酒中 β-G 活力均高于纯种发酵枸杞酒，说明非酿酒酵母 Y11 较酿酒酵母 M-23-7-14 能产生更多的 β-G，有利于枸杞酒中风味物质的形成。

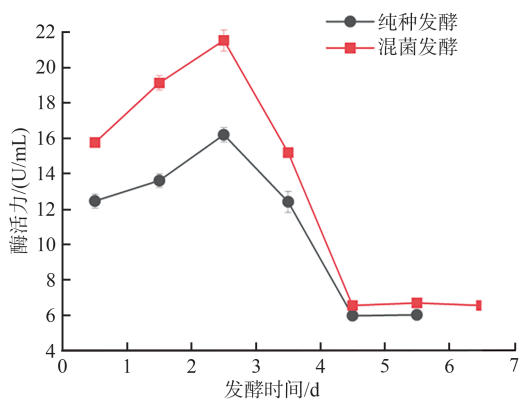


图 4 发酵过程中 β-G 活力的变化

Fig. 4 Changes of β-G activity during fermentation

2.6 混菌发酵对枸杞酒风味的影响

为验证 β-G 活力对枸杞酒风味物质的影响，采用 HS-SPME-GC-MS 分析混菌发酵对挥发性化合物的影响，结果见图 5。不同发酵方式的枸杞酒中共检测到 48 种挥发性化合物，其中酯类物质 17 种、醇类物质 11 种、醛类物质 6 种、酮类物质 8 种、萜烯类物质 3 种、酚类物质 3 种。酯类和醇类物质是枸杞酒中的主要风味化合物。相较于纯种发酵，混菌发酵枸杞酒中风味物质的总质量浓度提高了 21.7%。

纯种发酵枸杞酒中酯类物质有 15 种，酯类物质的总质量浓度为 1 963.33 μg/L，占总风味物质质量浓度的 28.2%；混菌发酵枸杞酒中酯类物质有 16 种，酯类物质的总质量浓度为 3 648.33 μg/L，占总风味物质质量浓度的 43.0%。混菌发酵枸杞酒中酯类物质较纯种发酵提高了 85.8%，其中乙酸乙酯提高了 118.8%，乙酸异戊酯提高了 65.9%。乙酯类物质可赋予枸杞酒水果香和花香，如乙酸乙酯（菠萝香、甜香）、乙酸异戊酯（香蕉香、甜香）、乙酸苯乙酯（蜂蜜花香），它们分别来源于乙醇、异戊醇、苯乙醇等相应醇的酯化[16]。有研究表明乙酯类物质的形成速率受多种因素影响，主要包括辅助底物、高级醇浓度、酰基辅酶 A 浓度以及参与合成和水解的酶活力[17]。这些乙酯类物质的提高，对提高枸杞酒香气具有一定贡献。

在枸杞酒的醇类物质中，异戊醇质量浓度最高，分别占纯种发酵和混菌发酵枸杞酒中高级醇质量浓度的 76.8% 和 77.9%。另外，苯乙醇和异丁醇的质量浓度也较高，为枸杞酒提供了花香和威士忌味；其他醇类物质的质量浓度低于其感官阈值，这与 Tao 等分析葡萄酒中醇类物质质量浓度的结果一致[18]。

在两种枸杞酒中，醛类和酮类物质种类较少，质量浓度较低，可能是由于醛酮类物质是较活泼

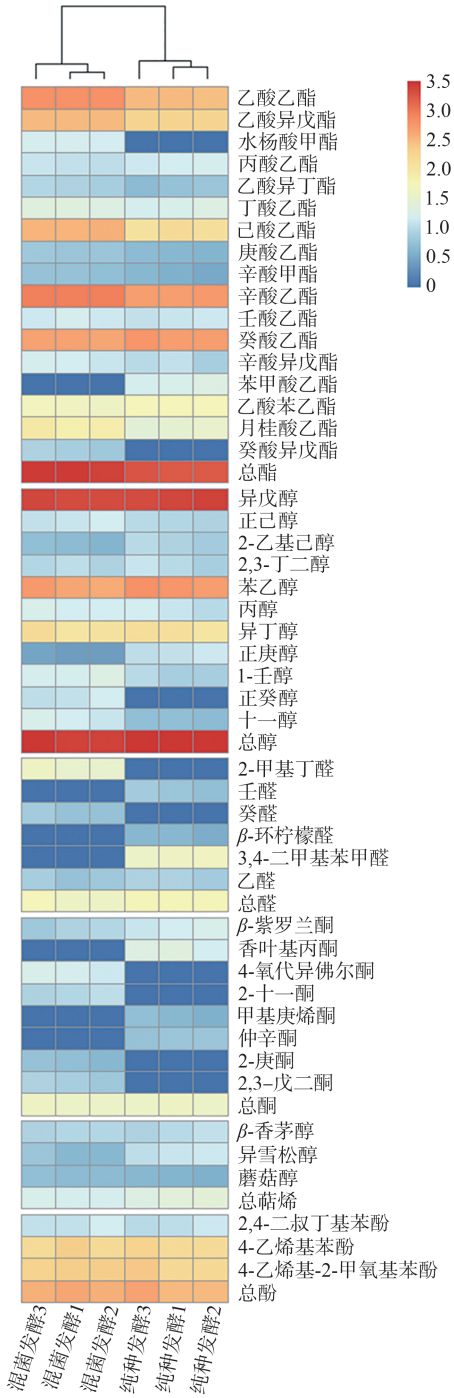


图5 纯种发酵和混菌发酵枸杞酒的挥发性物质质量浓度差异

Fig. 5 Difference in the mass concentration of volatile compounds between single-strain and mixed-strain fermented wolfberry wine

的中间体，在发酵过程中容易被还原成醇类等物质[19]。在两种枸杞酒中，醛酮类物质种类无太大差异，但纯种发酵枸杞酒中醛类物质质量浓度（65.86 μg/L）明显高于混菌发酵枸杞酒中醛类物质质量浓度（51.74 μg/L），说明非酿酒酵母可能具有抑制醛类物质产生的作用。

整体而言，相较于纯种发酵，混菌发酵枸杞酒中风味物质的总质量浓度提高了21.7%，表明非酿酒酵母产生的β-G可增加枸杞酒香气，对枸杞酒品质提升具有重要贡献。

3 结论

从‘宁杞5号’枸杞果干自然发酵液以及果园土壤中筛选得到6株产β-G能力较强的非酿酒酵母，通过对其进行生理特性及发酵性能的分析，选用生长最快且对环境耐受性最强的异常威克汉姆酵母Y11与酿酒酵母M-23-7-14混合发酵酿造枸杞酒。结果表明酵母Y11与酵母M-23-7-14采用顺序发酵（间隔12 h），能够充分发挥体系优势。混菌发酵枸杞酒中风味物质总质量浓度相较于纯种发酵提高了21.7%，尤其是酯类物质的质量浓度提高了85.8%。因此，高产β-G的非酿酒酵母用于混菌发酵枸杞酒可显著改善枸杞酒品质。

参考文献

[1] ZHAO D D, LI S G, HAN X, et al. Physico-chemical properties and free amino acids profiles of six wolfberry cultivars in Zhongning[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2020, 88: 103460.

[2] 徐亚男，史学伟，安洋洋，等. 产β-葡萄糖苷酶酵母菌的分离鉴定及酶学特性[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(10)：1100-1105.
XU Y N, SHI X W, AN Y Y, et al. Isolation, identification and enzymatic characteristics of yeasts producing β-glucosidase [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(10): 1100-1105.(in Chinese)

[3] 方可，李婷，朱艳冰，等. β-葡萄糖苷酶和α-L-鼠李糖苷酶对速溶绿茶粉水溶液香气的影响[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(1)：36-44.
FANG K, LI T, ZHU Y B, et al. Effects of β-glucosidase and α-L-rhamnosidase on the aroma of instant green tea infusion[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(1): 36-44.(in Chinese)

[4] YAN S B, CHEN X S, XIANG X B. Improvement of the aroma of lily rice wine by using aroma-producing yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* HN006 [J]. AMB Express, 2019, 9(1): 89.

[5] 何松，任建军，牛东泽，等. 阳山水蜜桃非酿酒酵母的筛选、发酵特性及产香气性能的研究[J]. 食品科技，2021，46(1)：1-7.
HE S, REN J J, NIU D Z, et al. Study on the screening, fer-

mentation and aroma production of non-*Saccharomyces cerevisiae* in Yangshan peach[J]. Food Science and Technology, 2021,46(1):1-7.(in Chinese)

[6] SHI W K, WANG J, CHEN F S, et al. Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. LWT-Food Science and Technology,2019,116:108477.

[7] 李亚辉,崔禾苗,董梅,等. 酒酒球菌31MBR的*β*-*D*-葡萄糖苷酶活性[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(8):799-802.
LI Y H, CUI H M, DONG M, et al. Assessment of *β*-*D*-glucosidase activity of *Oenococcus oeni* 31MBR[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(8): 799-802.(in Chinese)

[8] 冯文倩.低产乙醇本土非酿酒酵母的选育[D].杨凌:西北农林科技大学, 2021.

[9] 吴健,何伟,王建成,等. 酿酒酵母与产香酵母发酵特性及其相互作用规律[J]. 食品与发酵工业,2020,46(20):78-87.
WU J, HE W, WANG J C, et al. Fermentation characteristics and interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma-producing yeast[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(20):78-87.(in Chinese)

[10] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 葡萄酒、果酒通用分析方法:GB/T 15038—2006[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[11] 桑苇,唐柯,徐岩,等. 黑曲霉*β*-葡萄糖苷酶对葡萄酒酶解增香调控及香气物质的影响[J]. 食品与发酵工业,2015,41(5):8-13.
SANG W, TANG K, XU Y, et al. Effects of *β*-glucosidase from *Aspergillus niger* on flavoring regulation and aroma compounds of wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2015,41(5):8-13.(in Chinese)

[12] 葛有辉,王德良,曹健. 富含*β*-葡萄糖苷酶的酒香酵母在酿酒领域中的应用[J]. 酿酒科技,2011(2):96-99.
GE Y H, WANG D L, CAO J. The application of *Brettanomyces* rich in *β*-glucosidase in the field of liquor-making[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011(2):96-99.(in Chinese)

[13] SUN N, GAO Z Y, LI S Q, et al. Assessment of chemical constitution and aroma properties of kiwi wines obtained from pure and mixed fermentation with *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(1): 175-184.

[14] 刘晓柱,黎华,李银凤,等. 接种异常威克汉姆酵母对空心李果酒理化特性及香气组分的影响[J]. 食品科技,2020,45(11):21-27.
LIU X Z, LI H, LI Y F, et al. Effects of inoculation *Wickerhamomyces anomalus* on the physicochemical property and aroma profile of *Prunus salicina* lindl. cv 'kongxinli' fruit wine[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(11): 21-27.(in Chinese)

[15] 刘丛竹,郭波,布安琪,等. 果酒酵母和异常威克汉姆酵母混菌发酵复合水果的风味物质特征[J]. 安徽农业科学,2019,47(4):162-164,169.
LIU C Z, GUO B, BU A Q, et al. Flavor characteristics of fruit wine yeast and *Wickerhamomyces anomalus* yeast mixed fermentation[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(4): 162-164, 169.(in Chinese)

[16] STRIBNY J, QUEROL A, PÉREZ-TORRADO R. Differences in enzymatic properties of the *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* alcohol acetyltransferases and their impact on aroma-active compounds production[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 897.

[17] JIANG B, ZHANG Z W. Volatile compounds of young wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay varieties grown in the Loess Plateau region of China[J]. Molecules, 2010, 15(12): 9184-9196.

[18] TAO Y S, LI H, WANG H, et al. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China)[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21(8): 689-694.

[19] 程宏桢,蔡志鹏,王静,等. 基于GC-MS、GC-O和电子鼻技术评价百香果酒香气特征[J]. 食品科学,2021,42(6):256-264.
CHENG H Z, CAI Z P, WANG J, et al. Combined use of GC-MS, GC-O and electronic nose technology to evaluate the aroma characteristics of passion fruit wine[J]. Food Science, 2021, 42(6): 256-264.(in Chinese)

(责任编辑:史润东东)